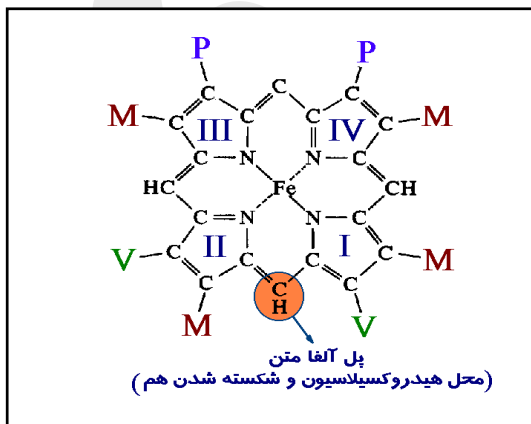
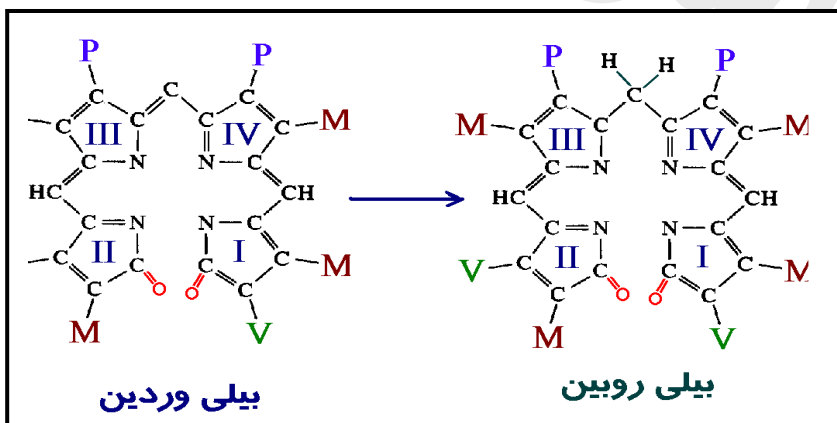


## بیلی روبین و روشهای اندازه گیری آن



بیلی روبین به عنوان یکی از رنگزدهای صفراوی بوده و به رنگ زرد- نارنجی می باشد. این ترکیب حاصل شکستن هم (Heme) در سیستم هم- اکسیژناز میکروزومی می باشد. این ترکیب (Heme) در ناحیه پل  $\alpha$ -متن (بین حلقه های I, II) و با دخالت NADPH و  $O_2$  ابتدا هیدروکسیله شده و سپس شکسته میشود (بطور همزمان آهن آن نیز اکسید شده و از آن جدا میگردد و وارد مخزن آهن بدن می گردد) و ایجاد بیلی وردین (سبزرنگ) مینماید که پس از هیدروژناسیون (احیا شدن بوسیله NADPH) تبدیل به بیلی روبین میگردد (اشکال بالا و پایین).

به طور متوسط روزانه ۳۰۰-۲۵۰ mg بیلی روبین تولید می گردد که از این میزان ۸۵ درصد، مشتق از Heme مربوط به Hb (هموگلوبین) حاصل از RBC های فرسوده می باشد که در سیستم رتیلولاندوتلیال کبد، طحال و مغز استخوان تخریب میگردند.



۱۵ درصد باقیمانده مربوط به کاتابولیسم پروتئینهای هم دار دیگر نظیر میوگلوبین، سیتوکرومها، پراکسیدازها و همچنین حاصل از پیش سازهای RBC می باشد که در مغز استخوان تخریب می گردند که به عنوان اریتروپوئز غیر موثر (Ineffective erythropoiesis) معروف میباشد.

بیلی روبین بعد از تولید در بافتهای محیطی وارد کبد می شود (به صورت متصل به آلبومین در خون انتقال می یابد و به کبد میرسد که به این شکل از بیلی روبین،  $\alpha$ -بیلی روبین یا بیلی روبین غیر کنژوگه یا بیلی روبین غیر مستقیم گفته می شود و در آب نامحلول است) و سریعاً توسط هیاتوسیتهای برداشت می گردد (به وسیله انتقال فعال وابسته به Carrier). سپس بیلی روبین به طور محکم (اما برگشت پذیر) به پروتئین های محلول متصل میگردد. از جمله این پروتئین ها Z protein, Ligandin میباشد. لیگاندین محکم تر به بیلی روبین متصل می گردد و باعث جلوگیری از بازگشت این ترکیب به پلاسما میگردد (برگشت آن را به تاخیر می اندازد). سپس توسط آنزیم (های) UDP-گلوکورونیل ترانسفراز، کنژوگاسیون صورت می گیرد و ایجاد دو نوع ترکیب به نامهای منوگلوکورونید بیلی- روبین (بیلی روبین نوع  $\beta$ ) و دی گلوکورونید بیلی روبین (بیلی روبین نوع  $\gamma$ ) می نماید که ۹۰ درصد آن بصورت  $\gamma$ - بیلی روبین و ۱۰ درصد بصورت  $\beta$ - بیلی روبین می باشد. سپس ترشح آن به درون صفرا صورت می گیرد (تصور می شود توسط یک سیستم انتقال فعال و

برخلاف گرادیان غلظتی صورت می گیرد). بعد از ورود این ترکیبات به درون روده، تحت تاثیر آنزیمهای  $\beta$ -گلوکوروניداز کبدی، روده‌ای و یا باکتریایی و pH قلیایی روده، هیدرولیز می گردند و تبدیل به رنگدانه‌های غیرکنژوگه می گردند. تحت اثر فلور میکروبی غیرهوازی روده‌ای، بیلی روبین غیرکنژوگه با احیا شدن به ترکیبات متنوعی از قبیل استرکوبیلینوژن، مزوبیلینوژن و اوروبیلینوژن تبدیل میگردد که مجموعاً تحت عنوان **اوروبیلینوژن** از آنها نام برده می شود. در حدود ۹۸ درصد از این ترکیبات باز جذب میگردند و وارد چرخه روده-ای- کبدی (Entro-hepatic) می گردند. بخش عمده‌ای از اوروبیلینوژن‌های باز جذب شده به وسیله کبد برداشت شده و توسط صفرا دوباره دفع میگردند. ۵-۲ درصد از آن وارد جریان خون عمومی بدن شده و در ادرار ظاهر میگردد. بنابراین میتوان گفت که در حال سلامت و شرایط طبیعی ممکن است مقادیر بسیار ناچیزی اوروبیلینوژن (۰-۲۴ mg در ۲۴ ساعت) در ادرار مشاهده گردد.

### ناهنجاریهای متابولیسم بیلی روبین

بیماری‌های ارثی و اکتسابی می‌توانند بر یک یا چند مرحله از مراحل درگیر در تولید، برداشت، ذخیره سازی و دفع بیلی روبین تاثیر بگذارند. افزایش میزان بیلی روبین در سرم تحت این شرایط به عنوان **هیپر بیلی روبینمی** شناخته می‌شود و بسته به نوع ناهنجاری، نوع بیلی روبین افزایش یافته می‌تواند متفاوت باشد. می‌توان هیپر بیلی روبینمی را طبقه‌بندی نمود. بعنوان مثال هیپر بیلی روبینمی را بسته به نوع بیلی روبین موجود در پلاسما (کنژوگه و غیرکنژوگه) می‌توان به **هیپر بیلی روبینمی احتباسی** ناشی از اضافه تولید، و **هیپر بیلی روبینمی برگشتی** ناشی از انسداد صفراوی و در نتیجه برگشت بیلی روبین به جریان خون طبقه‌بندی می‌نمایند. از بین دو نوع کنژوگه و غیرکنژوگه بیلی روبین، تنها نوع کنژوگه است که بدلیل محلول بودن در آب می‌تواند وارد ادرار گردد. همچنین تنها نوع غیرکنژوگه بیلی روبین است که بدلیل هیدروفوب بودنش می‌تواند از سد خونی و مغزی بگذرد و وارد دستگاه اعصاب مرکزی شود بنابراین فقط هیپر بیلی روبینمی غیرکنژوگه که در هیپر بیلی روبینمی احتباسی یافت می‌شود می‌تواند موجب آنسفالوپاتی شود (کرنیکتروس). بر همین اساس **یرقان کولوریک<sup>۱</sup>** فقط در هیپر بیلی روبینمی برگشتی ایجاد می‌شود و **یرقان آکولوریک** صرفاً در حضور مقادیر مازاد بیلی روبین غیرکنژوگه موجود می‌آید.

**کولوریک<sup>۱</sup>** به معنای وجود صفرا در ادرار

انواع هیپر بیلی روبینمی‌ها عبارتند از:

**الف- نوع غیر کنژوگه**

**ب- نوع کنژوگه**

### الف- هیپر بیلی روبینمی نوع غیر کنژوگه

#### ۱) یرقان فیزیولوژیک:

رایجترین حالت دیده شده می باشد که در آن بیلی روبین غیر کنژوگه در نوزادان افزایش می یابد. بطوریکه در ۵۰ درصد از نوزادان در ۵ روز اول تولد این افزایش وجود دارد که علت آن، همولیز اریتروسیتها و ناقص بودن بعضی از مراحل درگیر در متابولیسم بیلی روبین و دفع آن می باشد. در نوزادان Full-term مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه ۴-۵ mg/dl می باشد و در درصد کمی از تولدها تا ۴۸ ساعت پس از تولد مقدار آن به ۱۰ mg/dl می رسد که ۷-۱۰ روز پس از تولد به مقدار طبیعی بر میگردد.

#### ۲) هیپر بیلی روبینمی ناشی از عوامل پیش کبدی (Pre-hepatic):

در غیاب بیماری های کبدی نوعی از هیپر بیلی روبینمی مشاهده می شود که بیشتر ناشی از تخریب پیش از بلوغ اریتروسیتها و اریتروپوئز ناقص میباشد. از آنجایی که در این حالات سرعت تولید بیلی روبین بیش از ظرفیت دفعی آن می باشد، بیلی روبین غیر کنژوگه در سرم افزایش میابد.

#### ۳) سندرم های کریگلر- نجار (Crigler-Najjar):

بر دو نوع میباشد: سندرم کریگلر- نجار I و سندرم کریگلر- نجار II. که بر اثر نقص در آنزیم UDP-گلوکونیل ترانسفراز ایجاد می گردند. در نوع I که ناشی از نقص کامل آنزیم می باشد، یرقان شدید مادرزادی دیده می شود و مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه به ۵۰-۲۰ mg/dl نیز میرسد و در ۱۵ ماه اول زندگی معمولاً مرگ حادث می شود. در نوع II که خوش خیم تر می باشد و ناشی از نقص نسبی در آنزیم فوق می باشد، افزایش بیلی روبین غیر کنژوگه تا ۲۰ mg/dl مشاهده می گردد.

#### ۴) سندرم ژیلبرت (Gillbert):

حداکثر افزایش مشاهده شده در این سندرم ۳ mg/dl میباشد. ممکن است به علت نقص در آنزیم UDP-گلوکونیل ترانسفراز و یا نقص در انتقال غشایی ایجاد گردد.

#### ۵) هیپر بیلی روبینمی سمی (Toxic):

حاصل اختلال عمل کبد بر اثر سمومی مانند کلروفرم، آرسفنامینها و استامینوفن و ... می باشد.

#### ۶) هیپر بیلی روبینمی بر اثر تغذیه از شیر مادر:

استفاده نوزادان از شیر مادر (به ویژه زمانی که مادر از قرصهای ضد حاملگی نیز استفاده نماید) باعث افزایش بیلی روبین می گردد. قسمت اعظم بیلی روبین از نوع غیر مستقیم می باشد. علت افزایش دقیقاً مشخص نیست ولی گفته می شود که وجود FFA می تواند عمل برداشت Uptake بیلی روبین را کاهش دهد.

۷) هیپربیلیروبینمی بر اثر گرسنگی: در گرسنگی سطح بیلی روبین سرم افزایش می یابد که می تواند نتیجه افزایش تولید آن یا کاهش کلیرانس آن باشد. همچنین در گرسنگی افزایش سطح FFA و بیلی روبین با هم اتفاق می افتد که نشان دهنده این است که FFA در مرحله برداشت Uptake کبدی با بیلی روبین در اتصال به پروتئینهای غشا یا پروتئین Z رقابت کند.

### ب- هیپربیلیروبینمی نوع کنژوگه

۱) انسداد مجاری صفراوی: یا انسداد مجاری کبدی-صفراوی می تواند باعث جلوگیری از دفع بیلی روبین دی گلوکورونید و منوگلوکورونید و سایر ترکیبات دیگر گردد (یرقان کلتازی). این عامل باعث می گردد که این ترکیبات به درون وریدهای کبدی وارد شده و در خون و ادرار ظاهر گردند.

۲) سندرم دوبین-جانسون: به علت نقص در ترشح کبدی بیلی روبین کنژوگه به درون صفرا ایجاد می گردد. و یک ناهنجاری ژنتیکی خوش خیم می باشد که در آن میزان بیلی روبین تام (که شکل غالب آن از نوع کنژوگه می باشد) به ۵-۲ mg/dl می رسد.

۳) سندرم روتور: این سندرم با هیپربیلیروبینمی مزمن کنژوگه و سلامت بافت شناختی کبد همراه است و ممکن است به دلیل نقص در انتقال یونهای آلی (از جمله بیلی روبین) در سلولهای کبدی ایجاد شود.

\*\*\*\*\*

**اثر فنوباربیتال بر میزان بیلی روبین:** این دارو میزان بیلی روبین غیرکنژوگه را کاهش

می دهد. علت آن القای بیان آنزیم UDP-گلوکورونیل ترانسفراز (UDP-GT) می باشد. (نکته: در بیماران مبتلا به سندرم کریگلر-نجارا، فنوباربیتال هیچ تاثیری در غلظت بیلی روبین سرم ندارد. چرا؟)

**اثر نور بر میزان بیلی روبین:** نور مستقیم یا نور چراغ فلورسنت بطور قابل ملاحظه ای باعث

کاهش بیلی روبین پلاسما می گردد که از این خاصیت برای درمان هیپربیلیروبینمی نوزادان استفاده میگردد (فتوتراپی). در این حالت جذب نور در طول موج ۴۲۵-۴۷۵ nm توسط بیلی روبین باعث تجزیه آن شده و به سرعت از طریق صفرا، مدفوع و ادرار می گردد.

## روشهای اندازه گیری بیلی روبین

(۱) روش آنزیمی: با استفاده از آنزیم بیلی روبین اکسیداز میتوان بیلی روبین را به بیلی وردین تبدیل نمود. با استفاده از میزان کاهش جذب نمونه در محدوده طول موج ۴۰۵-۴۶۰ nm بعد از اثر آنزیم روی نمونه می توان مقدار بیلی روبین را محاسبه نمود.

بیلی وردین → بیلی روبین اکسیداز → بیلی روبین

(۲) روش مستقیم یا روش استفاده از بیلی روبینومتر (برای نوزادان):

از این روش برای سنجش میزان بیلی روبین تام نوزادان استفاده می گردد. به علت اینکه اکسی هموگلوبین ( $HbO_2$ ) دارای جذب قوی در طول موج ۴۵۴ nm می باشد (که ماگزیم جذب بیلی روبین در این طول موج می باشد)، ضروری است که تداخل مربوط به  $HbO_2$  حذف شود، برای این امر مقدار جذب بدست آمده در طول موج ۴۵۴ nm از مقدار جذب به دست آمده در طول موج ۵۴۰ nm کم می شود، به علت اینکه  $HbO_2$  در هر یک از این دو طول موج دارای جذب یکسانی می باشد، بنابراین بوسیله یک اسپکتروفتومتر و یا فتومتر بی کروماتیک (بیلی روبینومتر) مقدار آنها در هر دو طول موج قابل سنجش می باشد. در صورت وجود کاروتنوئیدها در نمونه نمی توان از این روش استفاده نمود زیرا این ترکیبات در ۴۵۴ نانومتر دارای جذب میباشند و باعث ایجاد خطا میگردند، بنابراین روشهای اسپکتروفتومتری مستقیم برای اندازه گیری میزان بیلی روبین در افراد بالغ مورد استفاده قرار نمی گیرد. از آنجائیکه معمولا نوزادان تا سه ماهگی هیچگونه کاروتنوئیدی مصرف نمی نمایند بنابراین برای سنجش بیلی روبین تام آنها می توان از این روش استفاده نمود. سرعت و نیاز به حجم نمونه کم از مزیت های مهم این روش می باشد. همچنین از این روش برای تعیین میزان بیلی روبین مایع آمینوتیک میتوان استفاده نمود که به عنوان شاخصی برای بیماری همولیزی در جنین ها استفاده می گردد.

$$\square \quad \text{جذب مربوط به بیلی روبین تام} = A_{454} - A_{540}$$

روش شیمیایی: مبنای روشهای شیمیایی بر واکنش معرف دیازو (سولفانلیک اسید دیاز ته) با بیلی روبین (کنژوگه و

غیرکنژوگه)، شکستن آن (با تاثیر بر کربن متیلن مرکزی ملکول بیلی روبین) و ایجاد ۲ ملکول آزوبیلی روبین می باشد. با افزایش الکل به محیط واکنش میتوان بیلی روبین تام را اندازه گیری نمود. واکنش های کلی در زیر آورده شده است.

در روش Evelyn-Malloy از محیط اسیدی که pH آن برابر با ۱/۲ است استفاده می گردد و رنگ ایجاد شده (آزوبیلی -

روبین) قرمز یا ارغوانی می باشد و با اندازه گیری میزان رنگ در طول موج ۵۶۰ nm غلظت بیلی روبین کنژوگه بدست می آید. برای بدست آوردن میزان غلظت بیلی روبین تام از متانول به عنوان حلال (Accelerator) استفاده می گردد و در این حالت بیلی روبین غیرکنژوگه نیز به حالت محلول در آمده و مقداری که مورد سنجش قرار می گیرد مربوط به بیلی روبین تام خواهد بود. با محاسبه

ساده می توان مقدار بیلی روبین غیر کنژوگه را محاسبه نمود. در روش Jenderassik-Grof از محلول سدیم بنزوات-کافئین به عنوان حلال (Accelerator) استفاده می گردد و محیط واکنش، قلیایی یا خنثی میباشد (که بعد از واکنش قلیایی می گردد pH=۱۳ و سپس جذب اندازه گیری می شود. در این pH، طیف جذبی آزوبیلی روبین به آبی شدید تبدیل می گردد که در طول موج ۶۰۰ نانومتر مورد سنجش قرار میگیرد.

کافئین و سدیم بنزوات باعث جداسازی بیلی روبین از آلبومین و حل شدن آن می گردد. استات سدیم مورد استفاده در آزمایش نقش بافر را داشته، از اسید آسکوربیک برای از بین بردن معرف دی آزوی اضافه و توقف واکنش استفاده میشود و تارترات پتاسیم نیز محیط را قلیایی نموده و باعث تشدید رنگ آزوبیلی روبین می گردد.

بیلی روبین کنژوگه + بیلی روبین غیر کنژوگه = بیلی روبین تام



#### نمونه مورد نیاز:

باید از سرم یا پلاسما (ناشتا) استفاده گردد بعلمت اینکه لیپمی وجود نداشته باشد. همچنین نمونه نباید همولیز باشد (مهمترین تداخل کننده منفی در این روش هموگلوبین است) و باید دور از نور سفید و UV و در دمای پائین نگهداری شود چون هر دو نوع بیلی روبین در این شرایط اکسید می گردند. نمونه ها در دمای یخچال تا سه روز و در دمای ۷۰- تا سه ماه پایدارند.

